



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Estudio de las susceptibilidades a
antibióticos de cepas de la bacteria
Aggregatibacter
actinomycetemcomitans de
pacientes marroquíes.**

M^a del Pilar Perdiguero Osuna.

Tutor: Prof. Dr. David Herrera González.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
III. MATERIAL Y MÉTODOS	9
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN	16
VI. CONCLUSIONES	22
VII. BIBLIOGRAFÍA	23
VIII. AGRADECIMIENTOS	28
ANEXO. TABLAS Y FIGURAS	29

I. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis, que se caracterizan por la destrucción de los tejidos periodontales de soporte dentario, son un grupo de enfermedades de etiología bacteriana. Sin embargo, la microbiota responsable de estas enfermedades es muy compleja, identificándose más de 500 especies bacterianas en la placa subgingival (*Ardila y cols. 2010, Herrera y cols. 2002*). Estas enfermedades tienen una etiología multifactorial, siendo resultado del fracaso de la relación entre la colonización de especies bacterianas patógenas sobre la superficie de los dientes y los tejidos de soporte dentario (*Mombelli y cols. 2011*). Estas especies bacterianas se adhieren a las superficies de los dientes y se organizan en una compleja estructura, la placa dental, considerada recientemente como un ejemplo de una biofilm o biopelícula.

La compleja estructura del biofilm periodontal consiste en múltiples comunidades bacterianas que residen en una matriz de glicocálix. Se ha demostrado que las bacterias agregadas a la superficie de los dientes, así como las que están integradas en la estructura del biofilm, presentan una reducida susceptibilidad a los antimicrobianos en comparación con las bacterias que se encuentran en estado planctónico (*Marsh y cols. 2005*). La microflora subgingival comprende gran cantidad de microorganismos, siendo los patógenos periodontales predominantemente anaeróbicos y facultativos anaeróbicos, gram positivos y gram negativos, destacando *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia*.

A. actinomycetemcomitans es un bacilo gram negativo, no móvil, sacarolítico, capnofílico, catalasa positivo, de extremos redondeados, que forma pequeñas colonias convexas y con un centro en forma de estrella cuando se cultiva en placas de agar sangre (*Slots y cols. 1980, Buchmann y cols. 2003*). *A. actinomycetemcomitans* es un importante patógeno a nivel periodontal: se ha demostrado que tiene la capacidad de invadir las células epiteliales gingivales humanas cultivadas in vitro (*Socransky y cols. 2009*) además ha sido aislada de varias infecciones intraorales y extraorales (*Slots y cols. 1980, Kim y cols. 2009*), y está fuertemente implicada en la etiología de la periodontitis agresiva, pero también ha sido aislada en sujetos con periodontitis crónica y sujetos sanos (*Pinheiro y cols. 2011*).

También se ha encontrado que dentro de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* puede haber una importante heterogeneidad: se distinguen 6 serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, conociéndose que los serotipos a, b y c se aíslan con mayor frecuencia a nivel oral, respecto a los serotipos d y e. Ciertos serotipos se asocian con formas específicas de periodontitis, con infecciones extraorales o con estados de salud periodontal (Kim y cols. 2009). Se ha observado que los serotipos a y b se encuentran más asociados a pacientes con periodontitis (como el clon JP2, que pertenece al serotipo b) y con infecciones no-orales asociadas a *A. actinomycetemcomitans*, y que el serotipo c, por el contrario, suele aislarse en sujetos sanos (Kim y cols. 2009, van der Reijden y cols. 2008). La distribución global de los diferentes tipos de *A. actinomycetemcomitans* no es homogénea, lo que implica que la asociación entre el serotipo y el estado periodontal puede depender de la localización geográfica y/o grupo étnico (van der Reijden y cols. 2008).

A. actinomycetemcomitans produce distintos factores de virulencia que están involucrados en la destrucción de los tejidos periodontales, destacando una leucotoxina codificada por 4 complejos genes, ltx C, ltxA, ltxB y ltx D (Sakellari y cols. 2011, Haraszthy y cols. 2000). Las alteraciones en estos genes permiten la existencia de cepas caracterizadas por delección de 530 pares de bases en la región promotora del gen operón de la leucotoxina (ltx), denominadas JP2, que presentan un incremento en la producción de leucotoxina en contraste con las cepas de dicha bacteria que no presentan esa delección. El clon JP2, altamente leucotóxico, tiene la capacidad de producir la lisis de los leucocitos polimorfonucleares humanos (Sakellari y cols. 2011, Haubek y cols. 2009, Haubek y cols. 2004, Haubek y cols. 2002, Haubek y cols. 2001, Haraszthy y cols. 2000).

Los aislados caracterizados con la cepa altamente leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* pertenecen exclusivamente a sujetos o familias con historia de periodontitis agresiva y con formas de periodontitis de aparición temprana (Haubek y cols. 2001, Haraszthy y cols. 2000). El papel del clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* en la etiología de la periodontitis agresiva es todavía desconocido, pero es un punto muy interesante y debatido por numerosos autores (Haubek y cols. 2004, Haubek y cols. 2009).

Esta cepa de *A. actinomycetemcomitans* ha sido aislada en inmigrantes africanos en países europeos. Recientemente se ha confirmado que el clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* está endémicamente presente en Marruecos y que está fuertemente asociados con la presencia de periodontitis de comienzo temprano (Haubek y cols. 2002). La infección con el clon JP2 no es solamente un factor de riesgo de periodontitis de comienzo temprano, sino que los pacientes infectados con dicho clon presentan estadios más avanzados de enfermedad que los pacientes libres de este clon (Sakellari y cols. 2011, Haubek y cols. 2004).

Varios estudios han examinado los efectos de diferentes tratamientos en parámetros clínicos y microbiológicos de las periodontitis. El tratamiento estándar de la periodontitis es actualmente inespecífico, basándose en la eliminación de los depósitos bacterianos, placa y cálculo, mediante un desbridamiento mecánico, (normalmente raspado y alisado radicular), con el objetivo de reducir la carga bacteriana total. Los resultados del tratamiento son predecibles y se puede mantener la salud periodontal estable durante un largo periodo de tiempo. Este procedimiento presenta una serie de limitaciones, sobre todo si como consecuencia de la enfermedad se han formado bolsas periodontales. Además, una pequeña, pero relevante proporción de pacientes, no responden adecuadamente a esta terapia (Kleinfelder y cols. 2000, Herrera y cols. 2002, Ardila y cols. 2010a, Ardila y cols. 2010b, Mombelli y cols. 2011).

Precisamente *A. actinomycetemcomitans* es altamente resistente al tratamiento mecánico, dado que retrospectivos y longitudinales han observado la persistencia de esta especie tras la terapia periodontal, así como de otras especies, que continuaban destruyendo los tejidos (Mombelli y cols. 2011). Por ello, la presencia de esta especie bacteriana patógena en los biofilm subgingivales puede explicar el uso de antimicrobianos en el tratamiento de la periodontitis. En el 5º Workshop Europeo de Periodoncia se concluyó que la placa dental muestra unas propiedades que son típicas del biofilm y las comunidades bacterianas en general, cuya consecuencia clínica es una susceptibilidad reducida a los agentes antimicrobianos (Herrera y cols. 2008).

El uso de antibióticos sistémicos como parte del tratamiento de la enfermedad periodontal ha sido debatido durante décadas. Esta falta de consenso se debe a las características específicas del biofilm bacteriano y de la microflora subgingival (Herrera

y cols. 2008). Los antibióticos más usados en el tratamiento de las periodontitis son metronidazol, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, amoxicilina-metronidazol, azitromicina y tetraciclinas (Liébana y cols. 2004, Heitz-Mayfield 2009).

Se han publicado ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia de la administración sistémica de amoxicilina/ácido clavulánico/potasio, metronidazol y tetraciclinas como adyuvante en el tratamiento de las periodontitis (Buchmann y cols. 2003). Herrera y cols. en 2002 concluyeron que los antibióticos deben utilizarse solamente como terapia coadyuvante a la terapia mecánica, siendo relevante en sujetos con estados avanzados de periodontitis o cuando presentan perfiles microbiológicos específicos. Sin embargo, Haffajee y cols. en 2003 señalaron que aunque existe suficiente información para sugerir la utilidad de los antibióticos, no se ha definido claramente el protocolo óptimo. La carencia de protocolos puede deberse en parte a las propiedades específicas de la biopelícula, dificultando el tratamiento de los patógenos periodontales (Herrera y cols. 2008, Heitz-Mayfield 2009).

Se debe tener en cuenta los efectos adversos del empleo de antimicrobianos sistémicos en el tratamiento de la periodontitis, entre ellos se destacan: efectos secundarios relacionados con el paciente, aumento de la aparición de resistencias bacterianas, siendo un problema de salud pública mundial. Este problema de resistencia bacteriana sugiere la necesidad de nuevas alternativas a los antibióticos utilizados actualmente (Herrera y cols. 2008). Todos estos factores deben considerarse cuando se prescriben antibióticos sistémicos, los cuales no se deben utilizar de manera rutinaria y habitual, teniendo siempre en cuenta las condiciones periodontales de los pacientes (Herrera y cols. 2008).

La susceptibilidad bacteriana varía de unas poblaciones a otras (van Winkelhoff y cols. 2005, Herrera y cols. 2008), no existiendo un consenso acerca de cual es el antibiótico de elección, así como tampoco de la dosis ni duración del tratamiento. Por lo tanto, la susceptibilidad bacteriana debe ser evaluada en una población definida para poder seleccionar el antibiótico más adecuado.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

A lo largo de mucho tiempo se ha debatido acerca de las diferentes posibilidades terapéuticas en las periodontitis, y se ha estudiado el posible papel de los antimicrobianos sistémicos en el tratamiento, pero sin llegar a un consenso acerca de cuál es el de elección.

Además, ha sido ampliamente investigada la importancia de los patógenos agresivos en periodontitis, específicamente en la población de Marruecos.

Sin embargo, existe un gran desconocimiento de la susceptibilidad de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* de pacientes marroquíes a los antibióticos sistémicos, siendo necesarios estudios que abarquen esta cuestión y arrojen luz sobre este tema.

HIPÓTESIS

La hipótesis de este estudio es que las cepas de *A. actinomycetemcomitans* aisladas de pacientes marroquíes con periodontitis agresiva pueden presentar niveles de resistencia más altos frente determinados antibióticos utilizados para el tratamiento de las periodontitis, respecto a otras poblaciones ya caracterizadas, y con cepas menos virulentas.

OBJETIVOS

- Estudiar la susceptibilidad a antibióticos de cepas de la bacteria *A. actinomycetemcomitans* en pacientes marroquíes diagnosticados de periodontitis.
- Evaluar la posible efectividad, respecto a susceptibilidad y resistencia de las cepas evaluadas, del tratamiento antibiótico en pacientes con periodontitis.
- Conocer cuál sería el antibiótico de elección, basado en los datos in vitro, para el tratamiento de la periodontitis en pacientes que presentan en su microbiota oral la bacteria *A. actinomycetemcomitans*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

La muestra de este estudio fueron pacientes marroquíes diagnosticados de periodontitis que iban a recibir tratamiento periodontal en la Facultad de Odontología de la Universidad Mohammed V, Souissi, de Rabat.

Todos los pacientes fueron informados verbalmente de la investigación y firmaron un consentimiento informado para entrar en el estudio.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes diagnosticados de periodontitis, de acuerdo con los criterios definidos por Armitage (1999).
- Pacientes con al menos 20 dientes.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes medicamente comprometidos.
- Pacientes en tratamiento ortodóntico.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal o tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Pacientes que requieran profilaxis antibiótica.

Se evaluaron las siguientes variables clínicas, registradas en seis localizaciones en cada diente, excluyendo los terceros molares:

- Índice de placa dicotómico.
- Índice de sangrado al sondaje dicotómico.
- Índice de supuración dicotómico.

- Profundidad de sondaje, medida en milímetros desde el margen gingival hasta el nivel alcanzable con la sonda periodontal.
- Recesión, medida en milímetros, desde el margen gingival a la unión amelo-cementaria.
- Pérdida del nivel de inserción clínica, sumando las dos variables anteriores, profundidad de sondaje y recesión.

Se realizaron radiografías periapicales, en las que se evaluó la pérdida ósea, medida desde la unión amelo-cementaria a la cresta alveolar ósea.

2. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Las muestras microbiológicas fueron recogidas por dos estudiantes del programa de postgrado de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras se tomaron una semana después de la realización del examen clínico y radiológico. Siempre que fue posible se recogieron muestras de placa de localizaciones sanas.

Las muestras se tomaron de la bolsa más profunda de cada cuadrante. En dichas localizaciones, la placa supragingival se eliminó usando una gasa estéril, tras lo que se secó con torundas de algodón y utilizando el chorro de aire.

Se introdujeron dos puntas de papel (Maillefer, Ballaigues, Suiza) en cada localización durante diez segundos.

Las puntas de papel fueron transferidas a los viales que contenían 1,5 ml de Fluido de Transporte Reducido (RTF), obteniendo un solo vial por paciente, agrupando las ocho puntas de los cuatro cuadrantes.

Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid para ser procesadas antes de que transcurrieran 24 horas desde que fueron tomadas.

3. CULTIVO, AISLAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

Las muestras fueron homogeneizadas utilizando un vórtex durante unos segundos y se realizaron diluciones seriadas en una solución de tampón sodio-fosfato (PBS), colocándolas en diferentes viales, identificadas con el número de dilución.

Se sembraron las muestras en dos medias diferentes:

- Medio agar sangre (No. 2 de Oxoid; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) con 5% de sangre de caballo y hemina (5 mg/l).
- Medio Dentaïd -1 (Dentaïd, Cerdanyola del Vallés, España) (*Alsina y cols. 2001*).

Para el aislamiento y crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* se utilizaron placas de medio Dentaïd-1, que fueron incubadas durante 3-5 días a 37°C con 5% de CO₂.

Tras este período, las placas se estudiaron para la identificación de *A. actinomycetemcomitans*, basándose en su morfología característica (pequeña colonia, 1 mm de diámetro, con bordes oscuros y forma de estrella en el centro), en la reacción de la catalasa y usando una serie de enzimas específicos (Rapid ID, NH system Romel Inc, EE.UU) (Figura 1).

En ocasiones no se identificó con certeza la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, por lo que se realizaron aislamientos de aquellas colonias dudosas en placas de Dentaïd-1, y se incubaron en las mismas condiciones que anteriormente y se volvieron a leer, consiguiendo cultivos puros de dicha bacteria.

4. PREPARACIÓN DE CRIOBOLAS Y ALMACENAMIENTO

De los cultivos puros obtenidos, se hizo una dilución nº 3 escala McFarland con hisopo estéril. Se vertió en el vial de la criobola, agitándolo entre las criobolas para difundir la especie por la suspensión del vial.

La suspensión sobrante se aspiró con una pipeta estéril, realizándolo varias veces para evitar que quedaran burbujas de aire entre las criobolas que estaban en esta suspensión bacteriana. El exceso de suspensión en el vial, dificulta la extracción individual de las perlas de los viales tras su almacenamiento para procedimientos posteriores.

Se rotularon los viales con una nomenclatura determinada, coincidente con la utilizada en las placas.

Los viales fueron colocados en cajas con una tapa y llevados a un congelador a una temperatura de -80°C.

Cuando se quiso proceder a la realización de las pruebas de susceptibilidad, se sacaron los viales del congelador. Con un asa de siembra esterilizada a la llama, se tomaron dos o tres criobolas de cada vial y se llevaron a una placa de agar sangre, de manera que se sembró la colonia bacteriana en la placa. Se realizaron dos o tres pases para conseguir la mayor viabilidad de la especie.

Cada una de las placas fue incubada bajo las condiciones apropiadas descritas anteriormente.

5. REALIZACIÓN DE E-TEST

La concentración mínima de inhibición (CMI) de metronidazol, amoxicilina /ácido clavulánico, azitromicina y amoxicilina se determinó usando E-test (*Nachnani y cols. 1992*).

Se colocaron en una placa de agar sangre de 15 centímetros de diámetro nº1 en la escala de McFarland de las colonias y se distribuyeron en 3 direcciones por la placa, dejándolo durante 10 min.

Las tiras E-test de cada uno de los antibióticos (AB BIODISK, Solna, Suecia), se llevaron a la placa con unas pinzas y se colocaron en los extremos de la placa de manera que la escala de CMI quedó colocada hacia arriba y que el final de las tiras quedaba cerca de los extremos de la placa. La tira debía quedar perfectamente en

contacto con la superficie de la placa, aunque pequeñas burbujas no suelen influir en el resultado, si existían grandes burbujas debajo de la tira se eliminaron ejerciendo una leve presión sobre la tira con las pinzas estériles. Una vez colocadas no se volvieron mover.

Las tiras se colocaron de dos en dos en cada placa, de la siguiente manera:

Placa 1: metronidazol-amoxicilina/ácido clavulánico.

Placa 2: azitromicina-amoxicilina.

Ya que así se consigue una adecuada separación entre los antibióticos evitando cualquier efecto sinérgico entre ellos.

Se incubaron las placas bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 3-4 días (80-85% N₂, 5-10% CO₂, 10% H₂). Pasado este tiempo se estudiaron las placas y se observan los halos de inhibición.

Tras este período de incubación, el crecimiento bacteriano fue claramente visible, comenzándose a formar un eclipse de inhibición alrededor de la tira. Entonces el valor de CMI se calculó en el punto de intersección entre el borde del eclipse de inhibición y la tira de E-test (Figura 2).

Cuando el crecimiento se produjo a lo largo de toda la tira es decir, no hay eclipse de inhibición visible, la CMI se fijó como mayor que el valor más alto en la escala de lectura. Mientras que cuando el eclipse de inhibición estuvo bajo la tira es decir, el borde del eclipse no interceptaba con la tira, la CMI se definió como menor que el valor mas bajo de la escala de lectura.

Todas las cepas fueron evaluadas por duplicado.

Bacteroides fragilis se usó como cepa de referencia para estos test de susceptibilidad.

6. ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos se hizo mediante estadística descriptiva, calculando los rangos, CMI50, CMI90 y porcentaje cepas susceptibles y resistentes, tal como se explica a continuación.

Los resultados, expresados en µg/ml, representan la cantidad de cada antibiótico para inhibir el crecimiento de cada cepa. Cada cepa fue evaluada dos veces y todos los resultados se agruparon para presentar los datos globales: rango, CMI50 (concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de las cepas) y CMI90 (concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas).

Para calcular el porcentaje de cepas resistentes y susceptibles se comparó el valor de cada cepa con un valor predefinido (*breakpoint*). Cuando los valores fueron menores, se consideró que la cepa fue susceptible. Mientras que se consideró resistente cuando fue superior o igual que el valor predefinido. Los valores predefinidos o *breakpoint* para cada antibiótico fueron los siguientes: metronidazol, 8 µg/ml; amoxicilina/ácido clavulánico, 3+0,5 µg/ml; amoxicilina, 3 µg/ml; azitromicina, 2 µg/ml (*van Winkelhoff y cols. 2005*)

VI. RESULTADOS

Las muestras se obtuvieron de 31 pacientes marroquíes que cumplieron los criterios de inclusión.

Se eliminaron del estudio 7 pacientes por falta de crecimiento de las muestras, por lo que la muestra final constó de 24 pacientes, de los se aislaron entre una y dos cepas que se mantuvieron a -80 °C, obteniéndose un total de 48 cepas.

Los valores obtenidos de cada una de las cepas para cada antibiótico son representados en la Tabla 1, habiendo sido cada cepa evaluada por duplicado.

Comparación de valores CMI.

En lo que respecta a los valores de CMI, se pueden observar en la Tabla 2 y Figura 3. Para metronidazol, el valor de la CMI₅₀ fue de 24 µg/ml mientras que la CMI₉₀ fue de >256 µg/ml, siendo los valores máximos recogidos. Para amoxicilina/ácido clavulánico fue 0,5 µg/ml para CMI₅₀ y 1 µg/ml para CMI₉₀, muy similares a los de amoxicilina, para la que los valores fueron 0,75 µg/ml y 1,5 µg/ml, respectivamente. En el caso de la azitromicina, CMI₅₀ fue 0,44 µg/ml y CMI₉₀ fue 24 µg/ml.

Porcentaje de cepas resistentes.

La Tabla 3 muestra el número total de cepas, el número de cepas resistentes y susceptibles y el porcentaje de cepas resistentes y susceptibles (Figura 4). El porcentaje de cepas resistentes para metronidazol fue 61,70%, mientras que para azitromicina fue del 31,25%.

Tanto para amoxicilina como amoxicilina/ácido clavulánico el porcentaje de cepas susceptibles fue del 100%.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, realizado sobre una muestra total de 24 pacientes marroquíes, de los cuales se aislaron una y dos cepas de la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, se calcularon los valores de CMI50 y CMI90 así como el nivel de resistencia, expresado en porcentaje, utilizando E-test (*Nachnani y cols. 1992*). Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* fueron aisladas de muestras de placa subgingival de los pacientes.

Se observó que los valores más altos de CMI90 y CMI50 se obtuvieron para metronidazol. Los valores más bajos de CMI50 se encontraron para azitromicina y los valores más bajos de CMI90 lo presentaba amoxicilina/ácido clavulánico.

Con respecto a los porcentajes de resistencia y susceptibilidad, se observó que tanto para amoxicilina/ácido clavulánico como para amoxicilina, el 100% de las cepas fueron susceptibles. En cambio, metronidazol presentó un porcentaje de 61,70% de cepas resistentes y azitromicina de un 31,25%.

Otros estudios que emplearon una metodología similar, como el de Müller y cols. en 2002, registraron valores de CMI50 para azitromicina de 1,5 µg/ml y de CMI90 de 3 µg/ml, siendo mayor el valor CMI90 registrado en nuestro trabajo (24 µg/ml). Para metronidazol, el valor CMI50 fue de 6 µg/ml y el CMI90 > 256 µg/ml. En este caso el valor CMI90 fue similar, y difirió el valor CMI50, que fue notablemente menor que en nuestra población marroquí (24 µg/ml).

Herrera y cols. en 2005, compararon la susceptibilidad antimicrobiana de cinco bacterias aisladas de pacientes con periodontitis en España y en los Países Bajos. En la población española registraron un valor CMI50 para metronidazol de 24 µg/ml y de CMI90 de >256 µg/ml; para amoxicilina/ácido clavulánico fueron 24 µg/ml y >256 µg/ml, respectivamente; para amoxicilina 0,25 µg/ml y 32 µg/ml, respectivamente; y para azitromicina de 1 µg/ml y 3 µg/ml, respectivamente. En la población holandesa, el valor CMI50 para metronidazol fue 1 µg/ml, para amoxicilina/ácido clavulánico 0,25 µg/ml, para amoxicilina 0,25 µg/ml y para azitromicina 0,38 µg/ml; y el valor CMI90 fue

de 64 µg/ml para metronidazol, 0,5 µg/ml para amoxicilina/ácido clavulánico, 0,38 µg/ml para amoxicilina y 0,875 µg/ml para azitromicina. Comparando estos resultados con los obtenidos en nuestra población de Marruecos, el valor CMI90 es el mismo para metronidazol en la población española que en la marroquí (>256 µg/ml). Para amoxicilina/ácido clavulánico ambos valores, CMI50 y CMI90, son similares entre las 3 poblaciones. El antibiótico que presentó valores CMI50 y CMI90 diferentes entre las poblaciones fue azitromicina, ya que en la población marroquí registró valores de 0,44 µg/ml y 24 µg/ml, respectivamente, es decir, claramente más elevados.

Con respecto a la resistencia bacteriana, el que menor porcentaje de resistencia presentó en la población española fue amoxicilina/ácido clavulánico, con un 10%. En cambio, en la población holandesa no hubo resistencia a este antibiótico, al igual que en nuestra población marroquí, que el 100% de las cepas fueron susceptibles. Los porcentajes de resistencia para metronidazol y azitromicina fueron similares en la población española a los obtenidos en nuestro trabajo (60% y 30%, respectivamente) Amoxicilina registró un 33,3% de cepas resistentes, superior a lo encontrado en nuestro estudio y en la población holandesa, en la que el 100% de las cepas fueron susceptibles. Por lo tanto, en la población holandesa, metronidazol fue el único que presentó resistencias, con un 27,8%, menor a lo registrado en España y Marruecos.

Se ha observado que el metronidazol es activo frente a un amplio rango de especies anaerobias. Como ya se ha señalado, en la microflora subgingival en periodontitis predominan las bacterias anaerobias estrictas, por lo que tiene sentido pensar que este fármaco sea el de primera elección en el tratamiento de la periodontitis avanzada. La mayoría de las especies evaluadas en los estudios presentan una adecuada susceptibilidad a este antibiótico, a excepción de *A. actinomycetemcomitans*, que no es una anaerobia estricta. Sin embargo, se sabe que el metabolito hidroxilo del metronidazol es hasta tres y cuatro veces más activo frente a dicha especie (*Pavicic y cols. 1992, Herrera y cols. 2005*) y que actúa sinérgicamente junto a la amoxicilina sobre este patógeno. Por esta razón, se ha demostrado que el metronidazol en combinación con la amoxicilina es efectivo en el tratamiento de la periodontitis asociada a *A. actinomycetemcomitans* (*Kulik y cols. 2008*).

Sin embargo, el valor CMI90 registrado en la población española y en nuestra población marroquí (256 µg/ml) de este patógeno parece indicar que esta combinación terapéutica puede no ser clínicamente tan efectiva como en otros países europeos. (Herrera y cols. 2005).

En 2008 Kulik y cols. realizaron otro estudio con una población sueca cuyo objetivo era conocer la susceptibilidad de 4 bacterias aisladas durante el periodo de 1991-2005. Para *A. actinomycetemcomitans*, el valor CMI50 de amoxicilina/ácido clavulánico fue de 1 µg/ml y el de CMI90 fue de 2 µg/ml; para la clindamicina fueron de 12 µg/ml y 32 µg/ml, respectivamente; para metronidazol fueron de 2 µg/ml y 128 µg/ml, respectivamente; para tetraciclinas de 0,38 µg/ml y 0,75 µg/ml, respectivamente; y para fenoximetilpenicilina fueron de 4 µg/ml y 16 µg/ml, respectivamente. Con respecto a nuestra población marroquí, para amoxicilina/ácido clavulánico los resultados son similares (0,5 CMI50 y 1 µg/ml CMI90), mientras que para el metronidazol nuestra muestra presenta valores superiores (24 µg/ml CMI50 y >256 CMI90).

Con respecto a los porcentajes de resistencia, obtuvieron un 100 % de susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* para amoxicilina/ácido clavulánico, de acuerdo con lo obtenido en otros estudios (Ardila y cols. 2010a, Herrera y cols. 2005) y con nuestra población marroquí. En cambio, para metronidazol el porcentaje de cepas susceptible fue del 79,2%, superior al de nuestra muestra (38,30%) y al registrado en otros estudios (Herrera y cols. 2005).

En otro estudio posterior de Ardila y cols. (2010 a), sobre un grupo de pacientes no tratados con periodontitis crónica de Colombia, trabajaron no solo con *A. actinomycetemcomitans* sino también con *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. En cuanto a los antibióticos con los que trabajaron fueron: amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, moxifloxacino y clindamicina. El valor CMI50 de *A. actinomycetemcomitans* para amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico fue de 0,25 µg/ml, para metronidazol de 6 µg/ml, para clindamicina fue de 0,125 µg/ml y para el moxifloxacino de 0,38 µg/ml. En cuanto al valor CMI90 fue de 32 µg/ml para amoxicilina, de 0,5 µg/ml para amoxicilina/ácido clavulánico, de > 256 µg/ml tanto para clindamicina y metronidazol y de 0,5 µg/ml para moxifloxacino. Los valores para el metronidazol fueron similares a los obtenidos en la población marroquí.

En cuanto a los valores de susceptibilidad, para amoxicilina/ácido clavulánico no registraron ninguna cepa resistente (Herrera y cols. 2005, Kulik y cols. 2008), en cambio para el metronidazol y la amoxicilina obtuvieron alrededor de un 80% de resistencia y para la clindamicina un 70%.

Con los resultados obtenidos, los autores concluyeron que *A. actinomycetemcomitans* fue la especie menos susceptible de todas las evaluadas y que moxifloxacino y amoxicilina/ácido clavulánico fueron los antibióticos más eficaces. Estudios previos en otros grupos también muestran una alta susceptibilidad a estos antibióticos de *A. actinomycetemcomitans* (Walker y cols. 2002, Herrera y cols. 2005, Kulik y cols. 2008), justificándose en el hecho de que el moxifloxacino es nuevo en el mercado y aún no ha sido utilizado en exceso.

En ese mismo año, publicaron otro estudio (Ardila y cols. 2010b) pero utilizando únicamente aislados de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos en el estudio anterior, coincidiendo con los obtenidos por otros autores (Herrera y cols. 2005, Kulik y cols. 2008).

Estos resultados in vitro deben de ser contrastados luego con estudios in vivo, principalmente diseñados como ensayos clínicos aleatorizados. Estos estudios generalmente tratan de evaluar el beneficio del tratamiento mecánico (raspado y alisado radicular) solo o en combinación con un tratamiento antibiótico. El empleo de una terapia combinada de amoxicilina con metronidazol tras la realización de un desbridamiento mecánico se traduce en una mejoría a corto plazo de variables clínicas como: profundidad de sondaje y nivel de inserción (Yek y cols. 2010, Heller y cols. 2011, Silva y cols. 2011). En cambio, la administración de metronidazol solo, no se ha demostrado que proporcione beneficios con respecto a la realización del tratamiento mecánico (Silva y cols. 2011). El uso de azitromicina como tratamiento coadyuvante a la terapia mecánica también ha sido estudiado, pero tampoco se han registrado diferencias estadísticamente significativas con respecto al procedimiento mecánico (Sampaio y cols. 2011). Sin embargo, sí se ha observado que el recuento de patógenos a nivel subgingival era menor al final del tratamiento en aquellos grupos donde se había llevado a cabo un tratamiento mecánico combinado con terapia antibiótica (Yek y cols. 2010, Heller y cols. 2011, Silva y cols. 2011, Sampaio y cols. 2011). Además, diferentes autores han registrado un aumento en la proporción de

bacterias no patógenas a nivel subgingival tras la administración de antibióticos (Heller y cols. 2011, Sampaio y cols. 2011).

También se han realizado estudios combinando el tratamiento antimicrobiano con cirugía periodontal.

Como el ensayo clínico publicado por Kleinfelder y cols. en 2000, en el que evaluaron los efectos de la administración de amoxicilina/ácido clavulánico sobre la microflora subgingival en pacientes que no respondieron adecuadamente a la terapia mecánica. De los 10 pacientes incluidos en el estudio, ninguno presentaba *A. actinomycetemcomitans* a nivel subgingival, pero sí estaban presentes la *P. gingivalis* y *Prevotella oralis* en 7 de los 10 pacientes; en cambio el *F. nucleatum* y *Parvimonas micra* se encontraron en 5 de los 10. Se evaluó la susceptibilidad de estos patógenos periodontales antes y después de la administración de amoxicilina/ácido clavulánico, tras cirugía periodontal.

Los resultados mostraron que *F. nucleatum* o *P. micra*, a pesar de resultar susceptibles a dicho antibiótico en los análisis de susceptibilidad realizados previamente a la terapia antibiótica, no en todos los casos se eliminaron completamente de la microflora subgingival tras el tratamiento con amoxicilina/ácido clavulánico. Los autores explican que la transmisión bacteriana o la re-infección podrían haber ocurrido durante la administración del antibiótico.

Como ya se ha explicado anteriormente, las especies bacterianas se organizan en una compleja estructura, la placa dental, considerada recientemente como un ejemplo de biofilm o biopelícula (Marsh y cols. 2005). El biofilm se debe tener en cuenta ya que tiene influencia sobre la actividad antimicrobiana en las bolsas periodontales, pudiendo ser en parte responsable de la diferencia entre la susceptibilidad en estudios in vitro y la eficacia clínica de la terapia antibiótica sistémica in vivo (Kleinfelder y cols. 2000).

Concluyen que si el objetivo final del tratamiento antibiótico sistémico como adyuvante a la terapia convencional es la eliminación de *F. nucleatum* o *P. micra* en pacientes que presenten este tipo de microorganismo, el uso de amoxicilina/ácido clavulánico no parece estar justificado.

La importancia de la organización bacteriana en forma de biofilms no debe de ser olvidada al revisar los resultados de los estudios previamente presentados.

Mouratidou y cols, en 2011, realizaron un estudio para comparar la susceptibilidad antimicrobiana tanto de cultivos bacterianos puros como de cocultivos bacterianos in vitro como un modelo de infección polimicrobiana. Los resultados mostraron que los cocultivos bacterianos presentan una menor susceptibilidad que los cultivos bacterianos puros a los antibióticos.

Takahashi y cols. en 2007 estudiaron la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* a diferentes antibióticos en diferentes fases de maduración del biofilm. Los autores emplearon: eritromicina, ofloxacino, ampicilina, cefalexina, tetraciclina y minociclina.

Dichos antibióticos fueron añadidos a las placas de cultivo en dos etapas, al principio y a las 24 horas. Los resultados demostraron que la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* a los antibióticos disminuye según se va produciendo la maduración del biofilm, a excepción del ofloxacino el cual ejerció un fuerte efecto inhibitor tanto en las fases tempranas como maduras de la formación de biofilm en todos los experimentos. Estos datos dificultan el diseño de un protocolo para el tratamiento antibiótico de la periodontitis. Por lo tanto, concluyen que es esencial un modelo de biofilm que contenga diferentes especies bacterianas para determinarla susceptibilidad antibiótica.

Cabe destacar que el presente estudio únicamente trabaja con cepas de *A. actinomycetemcomitans* de pacientes marroquíes, utilizando el cultivo como único medio de identificación, pudiendo influir notablemente en los resultados obtenidos. Además se debe tener en cuenta que la periodontitis, como hemos dicho, presentan una etiología multifactorial por lo que los resultados in vitro no siempre se correlacionan con los resultados in vivo. Estos factores pueden actuar como potenciales limitaciones de este y otros estudios basados en estudios in vitro sobre placas de cultivo.

Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio, las conclusiones se encuentran en el siguiente apartado.

VI. CONCLUSIONES

1. El valor de CMI₅₀ obtenidos de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* para metronidazol fue de 24 µg/ml, para amoxicilina/ácido clavulánico fue de 0,5 µg/ml, para amoxicilina fue de 0,75 µg/ml y para azitromicina fue de 0,44 µg/ml. Por otro lado, el valor CMI₉₀ fue de > 256 µg/ml para metronidazol, 1 µg/ml para amoxicilina/ácido clavulánico, 1,5 µg/ml para amoxicilina y 24 µg/ml para azitromicina.
2. Las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, aisladas de pacientes marroquíes, mostraron susceptibilidad para amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico en el 100% de las cepas; para metronidazol y azitromicina los niveles de resistencia fueron de, 61,70% y 31,25%, respectivamente.
3. Con los resultados obtenidos, no se puede concluir cuál es el antibiótico de elección para el tratamiento periodontal en pacientes marroquíes con *A. actinomycetemcomitans*, aunque amoxicilina y amoxicilina con ácido clavulánico mostraron los mejores resultados in vitro. En todo caso, son necesarios más estudios in vitro e in vivo, pero siempre teniendo en cuenta que el uso indiscriminado de antibióticos ocasiona niveles elevados de resistencia de las cepas de patógenos periodontales asociadas con periodontitis, y que existe una importante discrepancia en cuanto a la resistencia bacteriana entre diferentes países.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. (2012) Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39** (3), 284-94.

Alsina M, Olle E, Frias J. (2001) Improved, Low-Cost Selective Culture Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (2), 509-513.

Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC. (2010a) Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research* **45**, 557–563.

Ardila CM, López MA, Guzmán IC. (2010b) High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **15** (6), 947-51.

Armitage, GC. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.

Buchmann R, Müller RF, Van Dyke TE, Lange DE J. (2003) Change of antibiotic susceptibility following periodontal therapy. A pilot study in aggressive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **30** (3), 222-9.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley J C. (2003) Systemic anti-infective therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115–181.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. (2000) Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **71** (6), 912-22.

Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. (2002) Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of

Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (7), 657-60.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. (2001) Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Dental Research* **80** (6), 1580-3.

Haubek D, Ennibi OK, Vaeth M, Poulsen S, Poulsen K. (2009) Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Dental Research* **88** (9), 856-60.

Haubek D, Westergaard J. (2004) Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *International Journal of Paediatric Dentistry* **14** (1), 41-8.

Heitz-Mayfield LJ. (2009) Systemic antibiotics in periodontal therapy. *Australian Dental Journal* **54** (1), 96-101.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (3), 136–159.

Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (8), 45-66.

Heller D, Varela VM, Silva-Senem MX, Torres MC, Feres-Filho EJ, Colombo AP. (2011) Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *Journal of Clinical Periodontology* **38** (4), 355-64.

Kim TS, Frank P, Eickholz P, Eick S, Kim CK. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *Journal of Periodontology* **80** (12), 2020-7.

- Kleinfelder JW, Müller RF, Lange DE. (2000) Bacterial susceptibility to amoxicillin and potassium clavulanate in advanced periodontitis patients not responding to mechanical therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **27** (11), 846-53.
- Kulik EM, Lenkeit K, Chenaux S, Meyer J. (2008) Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61** (5), 1087-91.
- Liébana J, Castillo AM, Álvarez M. (2004) Periodontal diseases: microbiological considerations. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **9**, 82-91; 75-82.
- Miyake Y, Tsuruda K, Okuda K, Widowati, Iwamoto Y, Suginaka H. (1995) In vitro activity of tetracyclines, macrolides, quinolones, clindamycin and metronidazole against periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontal Research* **30** (4), 290-3.
- Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth A. (2011) Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery?. *Periodontology 2000* **55** (1), 205-16.
- Müller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Höffler U. (2002) In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (8), 736-42.
- Mouratidou A, Karbach J, d'Hoedt B, Al-Nawas B. (2011) Antibiotic susceptibility of cocultures in polymicrobial infections such as peri-implantitis or periodontitis: an in vitro model. *Journal of Periodontology* **82** (9), 1360-6.
- Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL. (1992) E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology* **63** (7), 576-83.
- Pavčić MJ, van Winkelhoff AJ, de Graaff J. (1992) In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **36** (12), 2634-8.
- Pinheiro ET, Kawamoto D, Ota-Tsuzuki C, Almeida LR, Nunes AC, Longo PL, Wikstrom M, Mayer MP. (2011) Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. *Journal of Periodontal Research* **46** (3), 310-7.

- Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology* **38** (2), 108-14.
- Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, Feres M. (2011) Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **38** (9), 838-46.
- Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. (2011) Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **38** (9), 828-37.
- Slots J, Evans RT, Lobbins PM, Genco RJ. (1980) In vitro antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **18** (1), 9-12.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal infections. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 5^o Ed. Madrid: *Médica Panamericana*; 2008.
- Takahashi N, Ishihara N, Kato T, Okuda K. (2007) Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59** (1), 59-65.
- van Der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, van der Velden U, van Winkelhoff AJ. (2008) Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (6), 487-92.
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32** (8), 893-8.
- Walker C, Karpinia K. (2002) Rationale for use of antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology* **73**, 1188-96.

Yek EC, Cintan S, Topcuoglu N, Kulekci G, Issever H, Kantarci A. (2010) Efficacy of amoxicillin and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* 81 (7), 964-74.

VIII. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi Director del trabajo fin de máster, Don David Herrera González, por su enorme trabajo realizado así como su entrega y dedicación que han sido, al igual que agradezco el ofrecimiento y la ayuda aportada en todo momento por María Mínguez Arnau, alumna del Máster de Periodoncia de la UCM.

También agradezco la colaboración de Ana O'Connor e Itziar González, personal del laboratorio de microbiología de la UCM, cuyo trabajo diario nos ayuda en cada una de las investigaciones llevadas a cabo por el Departamento.

ANEXO. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada cepa para cada antibiótico.

CEPA	METRONIDAZOL		AMOXICILINA/ÁC. CLAVULÁNICO		AMOXICILINA		AZITROMICINA	
1	4,000	3,000	1,000	1,000	1,500	0,750	24,000	24,000
2	>256	>256	0,032	0,125	0,500	0,250	4,000	4,000
3	3,000	3,000	0,500	0,500	0,750	0,750	0,500	0,750
4	1,000	0,500	0,190	0,380	0,900	0,500	0,064	0,064
5	>256	>256	0,500	0,500	1,000	0,750	0,250	0,380
6	>256	>256	0,750	1,000	1,500	1,000	0,380	0,125
7	>256	>256	1,000	1,000	1,000	1,000	0,250	0,125
8	>256	>256	0,250	0,250	1,500	0,750	>256	>256
9	1,000	1,000	0,380	0,380	0,500	0,500	0,094	0,094
10	1,000	4,000	0,500	0,380	0,500	0,750	0,125	0,064
11	24,000	32,000	0,500	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000
12	>256		0,250		0,500	0,380	0,047	0,094
13	2,000	1,500		0,500	0,750	0,750	1,000	1,000
14	>256	>256	0,250	0,250	1,000		4,000	2,000
15	32,000	24,000	0,500	1,000	1,500	1,000	1,000	1,000
16	64,000	48,000	0,750	0,750	1,000	2,000	2,000	1,500
17	24,000	24,000	1,000	1,000	1,000	1,000	2,000	2,000
18	>256	12,000	1,000	0,500	1,000	1,000	0,094	<0,016
19	>256	18,000	1,500	0,500	1,000	1,500	2,000	2,000
20	>256	>256	0,500	0,500	1,000	0,500	>256	>256
21	32,000	32,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,094	0,094
22	1,000	1,000	0,380	0,250	0,380	0,380	0,094	0,125
23	1,000	1,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,125	0,064
24	2,000	0,190	0,250	0,250	0,500	0,500	0,125	0,094

Tabla 2. Rango de concentración mínima de inhibición (CMI) tanto de CMI50 (µg/ml) como CMI90 (µg/ml) de cada cepa para cada antibiótico.

CEPA	METRONIDAZOL	AMOXICILINA/Á.C.CL AVULÁNICO	AMOXICILINA	AZITROMICINA
Rango (µg/ml)	0.190->256	0.250-1.500	0.380-2.000	<0.016->256
CMI50 (µg/ml)	24	0,5	0,75	0,44
CMI90 (µg/ml)	>256	1	1,5	24

Bacteroides fragilis: 0,250-1,000

Tabla 3. Número de cepas resistentes y susceptibles, así como el porcentaje de cepas resistentes y susceptibles.

CEPA	METRONIDAZOL	AMOXICILINA/ÁC. CLAVULÁNICO	AMOXICILINA	AZITROMICINA
N susceptibles	18	46	47	33
N resistentes	29	0	0	15
%susceptibles	38,30	100	100	68,75
%resistentes	61,70	0	0	31,25

Valores de referencia (*breakpoint*): metronidazol, 8 µg/ml; amoxicilina/ác.clavulánico, 3+0.5 µg/ml; amoxicilina, 3 µg/ml; azitromicina, 2 µg/ml.

Figura 1. Imagen macroscópica de las características morfológicas de una colonia A. *actinomycetemcomitans* creciendo en medio Dentaid-1.



Figura 2. Resultado E-test con la formación de un eclipse de inhibición alrededor de la tira.

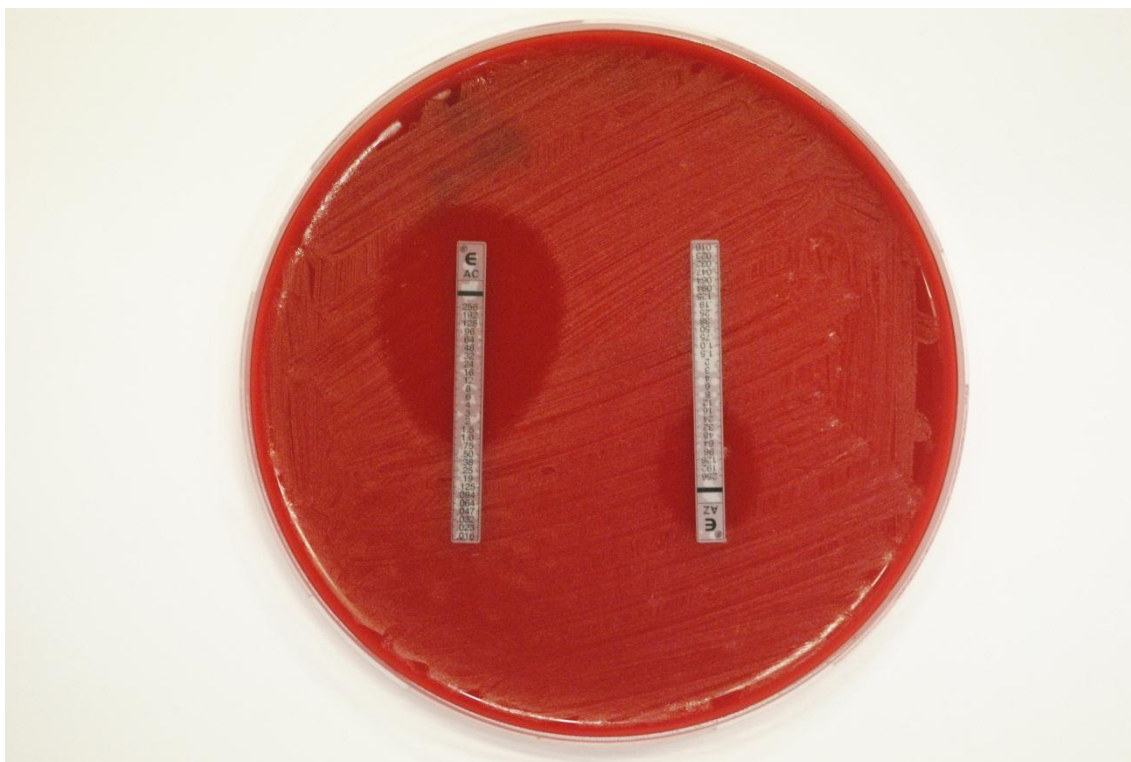


Figura 3. Rango de concentración mínima de inhibición (CMI) tanto de CMI50 ($\mu\text{g/ml}$) como CMI90 ($\mu\text{g/ml}$) de cada cepa para cada antibiótico.

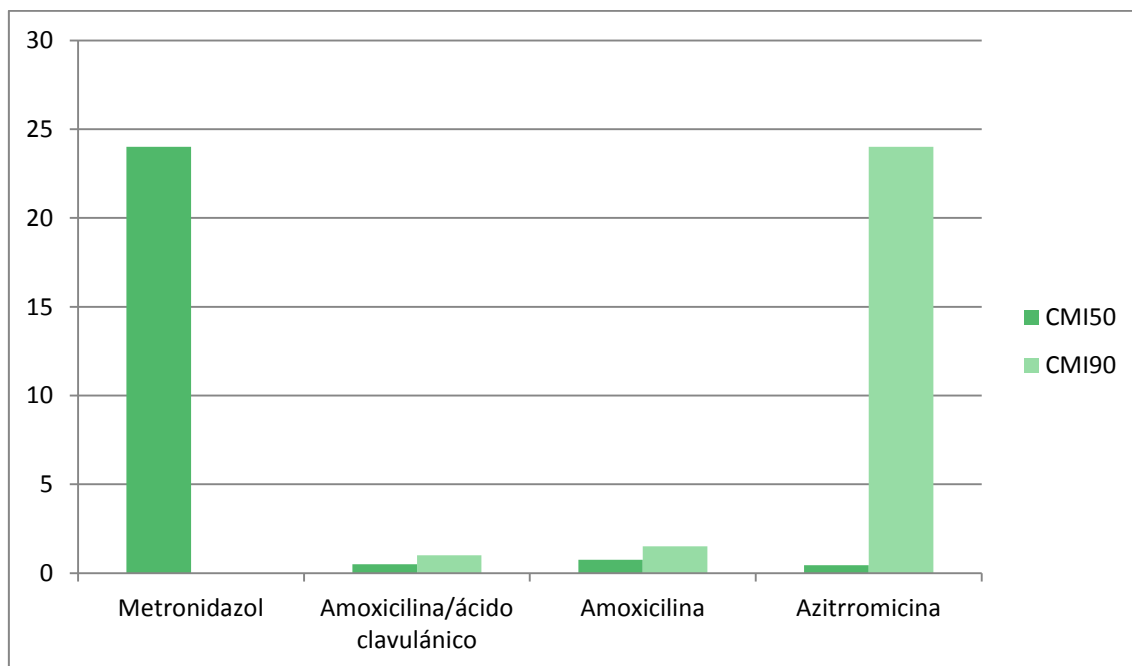


Figura 4. Porcentaje de cepas resistentes y susceptibles para metronidazol, amoxicilina/ácido clavulánico, amoxicilina y azitromicina.

